

何胡军, 鲁志松, 刘英帅, 等. 2006 气态甲醛致小白鼠肝脏 DNA-DNA 交联的研究 [J]. 环境科学学报, 26(3): 501 - 504

He H J, Lu Z S, Liu Y S, et al. 2006. Study on DNA-DNA crosslinks induced by air formaldehyde in mice liver[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 26(3): 501 - 504

[免审稿件] 责任编辑提示: 欢迎广大读者针对免审稿件提出各种意见

气态甲醛致小白鼠肝脏 DNA-DNA 交联的研究

何胡军¹, 鲁志松², 刘英帅², 彭光银¹, 丁书茂¹, 杨旭^{1,*}

1. 华中师范大学 生命科学学院, 武汉 430079

2. 南洋理工大学 化学与生物医学工程学院, 新加坡 639798

收稿日期: 2005-11-16 修回日期: 2006-01-05 录用日期: 2006-01-23

摘要: 为了探讨气态甲醛致生物体内 DNA-DNA 交联效应, 进一步评价甲醛的遗传毒性作用, 以昆明纯系小鼠为实验材料, 进行了 72 h 动态吸入式连续染毒, 采用荧光检测法检测甲醛染毒后小鼠肝细胞 DNA-DNA 交联形成的效应. 实验结果表明, $0.5 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$ 的气态甲醛能引起明显的 DNA-DNA 交联 ($p < 0.05$), 较高浓度的甲醛 ($1.0 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$, $3.0 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$, $p < 0.01$) 可以产生极为明显的 DNA-DNA 交联作用. 以上实验结果显示了 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$ 的气态甲醛就能致生物体内 DNA-DNA 交联效应, 且随着浓度的升高 DNA-DNA 交联率越高.

关键词: 甲醛; DNA-DNA 交联; 遗传毒性; 体内

文章编号: 0253-2468(2006)03-0501-04

中图分类号: R994.6

文献标识码: A

Study on DNA-DNA crosslinks induced by air formaldehyde in mice liver

HE Hujun¹, LU Zhisong², LIU Yingshua², PENG Guangyin¹, DING Shumao¹, YANG Xu^{1,*}

College of Life Science, Central China Normal University, Wuhan 430079

School of Chemical and Biomedical Engineering, Nanyang Technological University, Singapore 639798

Received 16 November 2005;

received in revised form 5 January 2006;

accepted 23 January 2006

Abstract: In order to explore the effect of DNA-DNA crosslinks and estimate the genotoxicity induced by formaldehyde, this study used Kunming mice as the experiment objects, which were exposed to the air formaldehyde in 72 hours. This experiment applied fluorescence measurement to detect DNA-DNA crosslinks formation effect of the liver cells of the mice after the exposure to air formaldehyde. Results show that $0.5 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$ air formaldehyde can induce DNA-DNA crosslinks formation in vivo ($p < 0.05$), and in a dose-dependent manner at higher concentrations ($1.0 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$, $3.0 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$, $p < 0.01$). Air formaldehyde exposure, even as low as $0.5 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$, induced DNA-DNA crosslinks in mice liver easily, and the effect level is taken in a dose-dependent manner within $3.0 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$ range.

Keyword: formaldehyde; DNA-DNA crosslinks; genotoxicity; in vivo

甲醛 (Formaldehyde, FA) 是一种常见的装修型化学性室内空气污染物, 也是一种生物内源性有机化合物, 因其来源广、毒性大、污染时间长等特点, 已成为我国主要的室内空气污染物之一. 2004 年世界卫生组织下属机构——国际癌症研究中心 (IARC) 领导的工作小组评估了甲醛致癌效应的相关研究报告后, 将甲醛确定为 1A 类物质 (人类致癌物) (International Agency for Research on Cancer, 2004). 已有不少研究证实 (Liu et al., 2006) 甲醛是一种具有广泛遗传毒性和致癌性的室内空气污

染物. 不同浓度的甲醛可以诱导很多种类的细胞产生突变, 这种突变可能是点突变, 也可能是大段 DNA 片段的改变, 包括染色体的断裂, 姐妹染色单体的交换, DNA-DNA 交联 (DNA-DNA crosslinks, DDC), DNA-蛋白质分子交联 (DNA-Protein crosslinks, DPC) 等. 其中交联作用可以引起复制的错误而导致突变, 因此, 学者们将 DDC、DPC 作为甲醛潜在突变的分子标志物. 甲醛诱发 DDC 可分为链内交联和链间交联, 形成 5 种交联物: G-G、A-A、A-G、A-C 和 G-C (夏世钧等, 2001).

基金项目: 国家自然科学基金项目 (NO. 30570799)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (NO. 30570799)

作者简介: 何胡军 (1980—) 男, 硕士研究生; * 通讯作者 (责任作者), E-mail: yangxu@mail.ccnu.edu.cn

Biography: HE Hujun (1980—), male, postgraduate; * Corresponding author, E-mail: yangxu@mail.ccnu.edu.cn

Conaway等(1996)在综述中提出甲醛除可导致DPC外,也可导致DDC,但是相关研究报告却所见甚少. 裴著革等(2004)用改良的彗星试验检测甲醛染毒后的人外周血淋巴细胞,发现高剂量组形成的交联水平在加入蛋白酶K处理后无显著变化,这也提示了DDC的存在. DDC的形成引起了复制的错误和控制转录的基因变异,从而诱发癌症. 因此,本文结合了鲁志松等人的彗星实验结果,通过体内实验对甲醛所致DDC的形成作了更进一步的研究.

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 实验材料

实验材料为湖北省预防医学院实验动物中心所提供的SPF级昆明纯系雄性小鼠,4~5周龄,体重20g左右.

1.2 主要试剂和仪器

试剂:10%的福尔马林溶液(SIGMA公司),十二烷基硫酸钠(Merk公司),蛋白酶K(Merk公司),Hoechst 33258荧光染料(SIGMA公司),其它试剂如KCl、NaH₂PO₄、Na₂HPO₄、EDTA均为国产分析纯.

仪器:WH-2型小型智能环境气候舱(武汉市宇信科技开发有限公司),4160-2型甲醛测定仪(美国INTERSCAN公司),三用电热恒温水箱(北京市长源实验仪器厂),涡旋器,低温冷冻离心机(Eppendorf 5415R),F-4500型荧光分光光度计(日本日立).

1.3 实验方法

染毒气体制备:采用SIGMA公司生产的10%福尔马林溶液,配制成不同浓度甲醛溶液,置于WH-2小型智能型环境气候舱通气湿度发生装置中,通过小型环境气候舱设定的恒定湿度参数,使之能稳定连续地输出实验所需浓度的气态甲醛. 小型环境气候舱的操作条件见表1. 气体的甲醛浓度由4160-2型甲醛测定仪测定,灵敏度为0.012 mg·m⁻³,准确度为±0.024 mg·m⁻³,读数即为甲醛浓度. 本次实验设定的浓度组为空白组0 mg·m⁻³和0.5、1.0、3.0 mg·m⁻³暴露组.

气态甲醛染毒实验:采用动态吸入式染毒,将24只昆明纯系雄性小鼠随机分为对照组和3个甲醛染毒组,每组6只小鼠. 染毒组在玻璃染毒缸(由8.4L通气式干燥器改制而成)中连续动态染毒72h,进气口甲醛浓度分别设定为0.5、1.0和3.0 mg·m⁻³(23℃);对照组也在同样的染毒缸中吸入经过滤的新鲜空气(甲醛浓度<0.01 mg·m⁻³). 染

毒期间,动物定时进食和饮水,每天2次. 实验动物在染毒结束后立即脱颈处死.

表1 小型环境测试舱的操作条件

Table 1 The operation conditions of the small environmental test chamber

气温 /	气湿	空气交换率 / (L·min ⁻¹)
23.0 ± 0.5	(45.0 ± 0.5) %	1.00 ± 0.01

肝细胞悬液制备:实验动物脱颈致死,迅速取出肝脏,用冷的PBS(pH=7.5)缓冲液洗去表面血迹,再用眼科剪剪成糜状(约1mm³的组织块),4层纱布过滤;将细胞滤液在1500r·min⁻¹下离心5min,去掉上清液,用0.5mL的PBS(pH=7.5)缓冲液重悬浮细胞并调整细胞密度,苔盼蓝排斥法检测细胞活力,细胞存活率大于95%,细胞密度为10⁵~10⁶个·mL⁻¹. 得到肝细胞悬液待用.

1.4 DDC的检测 (Liu *et al*, 2006; Pu *et al*, 1999; Zhang *et al*, 2001; Raquel *et al*, 2002)

荧光检测法的原理:荧光检测法是通过裂解细胞、分离DNA,进行DNA变性、荧光染料染色、最后通过荧光分光光度计进行其荧光强度的检测. 荧光染料hoechst 33258仅能与DNA双链结合,因此,我们通过这个特性将每组DNA分成等量的两份,一份在100℃变性,随后快速冷却至23℃,使其中游离的DNA不致复性. 再用荧光染料分别对两份DNA染色,最后测出变性前后的DNA的荧光强度. 根据下式计算DNA-DNA交联率: $C_i = (f_n - f_0) / (1 - f_0)$, 式中C_i为DNA-DNA交联率, f_n为甲醛染毒组中热变性后的荧光强度, f₀为对照组中热变性后的荧光强度.

细胞裂解:在制备好的肝细胞悬液中分别加入0.5mL(2%)的SDS溶液并轻微振荡,然后在65℃水浴中加热10min待用.

游离DNA、DDC与DPC的分离:从水浴中取出上述待用样品并加入100μL溶于(20mmol·L⁻¹ Tris-HCl)的1.0mol·L⁻¹的KCl(pH=7.5),将混合液6次穿过1mL的聚丙烯枪头,从而使DNA长度统一. 由于SDS可以和游离的蛋白质及DNA蛋白质交联结合而沉淀下来,而游离的DNA、DDC留在悬液中. 然后将混合液在冰上冷冻5min后,SDS-K⁺沉淀(包括蛋白质和DPC)可以形成,再在10000r·min⁻¹、4℃下离心5min收集沉淀,将上清转入另一离心管(5mL)中.

DPC中结合DNA的分离:将上述沉淀重悬浮于

0.5 mL 的清洗缓冲液中,然后加入 0.5 mL 的蛋白酶 K ($0.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,溶于清洗缓冲液中配制),50 水浴消化 3 h,再在冰上骤冷 5 min,然后在 $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、4 下离心 10 min,收集上清液,将上清液转入上述 5 mL 离心管中.再向沉淀中加入 1 mL 的清洗缓冲液 ($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KCl}$, $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ EDTA}$, $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Tris} - \text{HCl}$, $\text{pH} = 7.5$)重悬,65 水浴中加热 10 min,冰上骤冷 5 min, $10000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、4 下离心 5 min 收集沉淀,重复清洗步骤 3 次,每次都得上清转入上述 5 mL 离心管中.

游离 DNA 变性:将上述 5 mL 离心管中的上清液混匀后各取 1 mL 分装两管作为待测样品.一管在 100 水浴中加热 5 min 进行热变性,随后快速冷却至 23 ,使其中游离的 DNA 变性后不致复性.

染色与检测:向上述待测样品中加入 1 mL 新鲜配制的 $400 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的荧光染料 Hoechst 33258,使终浓度为 $200 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,置于暗处 30 min;用 F-4500 型荧光分光光度计在 353 nm 激发光和 455 nm 发射光下测得其荧光值,计算 DNA-DNA 交联率.

2 结果与分析 (Results and analysis)

2.1 气态甲醛致小鼠肝细胞 DDC 形成效应

不同浓度气态甲醛致小鼠肝细胞 DDC 形成的结果见图 1.由图 1 可见,经 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$ 气态甲醛染毒处理后,小鼠肝细胞 DNA-DNA 交联率与对照组相比有显著增加 ($p < 0.05$);当甲醛浓度升高到 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$ 和 $3.0 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$ 时, DNA-DNA 交联率显著上升,与对照组相比有极显著差异 ($p < 0.01$).该结果说明气态甲醛在低浓度时引起了一定的 DNA-DNA 交联,在较高浓度时,甲醛能够显著地诱导 DDC 的

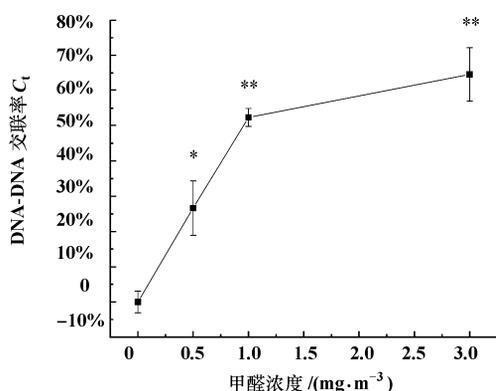


图 1 气态甲醛致小鼠肝细胞 DDC 形成的效应

Fig 1 DDC formation in mice liver cells induced by air formaldehyde (与空白对照组比较 * : $p < 0.05$, * * : $p < 0.01$)

形成,且甲醛浓度与 DNA-DNA 交联率之间具有明显的剂量效应关系.由折线图可见, DNA-DNA 交联率随着甲醛浓度的增加而增加,在气态甲醛浓度较低时,其增加的趋势较大.

3 讨论 (Discussion)

3.1 彗星实验对 DNA 交联作用的检测

近几年来,彗星实验也被用于各种环境污染物致 DNA 交联作用的检测.在检测甲醛所致的 DNA 交联作用中,采用彗星实验所获结果只是一种推测性结果.在鲁志松等 (2003) 的研究中,对人体颊黏膜细胞经气态甲醛染毒后进行彗星实验.他的实验结果表明当气态甲醛浓度为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$ 时, Tail Moment 和 Tail DNA 与对照组相比均有极显著的提高 ($p < 0.01$).这说明在 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$ 时,气态甲醛可以导致 DNA 链的断裂.当气态甲醛浓度为 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$ 时, Tail Moment 和 Tail DNA 较 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$ 时有一定程度的下降,这说明在 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$ 时,气态甲醛可能导致 DNA 交联.当气态甲醛浓度为 $3.0 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$ 时, Tail Moment 和 Tail DNA 显著下降,与对照组相比无显著差异.这说明在 $3.0 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$ 的水平下,气态甲醛引起了交联作用.该文作者据此推测甲醛浓度在高于 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$ (包括 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$) 时,即能致 DNA 交联形成.

3.2 荧光检测法与甲醛致 DDC 效应

国际上关于甲醛导致 DNA-DNA 交联的研究报道很少 (Conaway *et al*, 1996; 裘著革等, 2004),对于甲醛在体内是否可以导致 DDC 的形成尚存在争议.

通过彗星实验仅能推测甲醛可能致 DNA 交联,而且这种交联有可能是 DDC,也有可能是 DPC.而在本实验中我们采用荧光检测法直接对甲醛所致的 DDC 进行了分析.从而更有针对性更准确地得出甲醛在 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$ 时即能引起 DDC 的形成,随着甲醛浓度的增加,小鼠肝细胞 DNA-DNA 交联率逐渐增大,且呈明显的剂量效应关系.因此,本研究直接反映了甲醛可导致 DDC 的形成,并作了进一步定量的确定,具有很重要的意义.

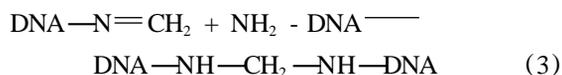
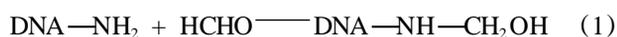
3.3 甲醛的远距离毒性效应

一些体外实验研究表明甲醛可以与 DNA 碱基、核苷、核苷酸以及完整 DNA 形成加合物.甲醛与水溶液的小牛胸腺 DNA 反应 40d 后,体系中可检测到多个由亚甲基连接的 DNA 碱基二聚体.本次进行的

是体内实验,小鼠进行动态吸入式染毒,然后进行其肝细胞的 DDC 检测,从而更直接更准确地反映了甲醛致 DDC 效应.而且还反映了甲醛可能具有远距离毒性作用.尽管还存在一定的争议,但是我们的研究给出了一定的佐证.此次实验是采用吸入式染毒,肝脏不是靶器官,但是体内实验结果显示了经过甲醛染毒后,导致小鼠肝细胞明显的 DDC 效应,从而我们推断甲醛可能具有远距离毒性作用.而远距离毒性正是甲醛致白血病的重要理论基础之一 (Heck *et al*, 2004).因此,此次实验有一定的理论意义.

3.4 DNA-DNA 交联机制 (Conaway *et al*, 1996)

甲醛致 DDC 可能涉及两个步骤.第一个步骤是甲醛与 DNA 通过可逆反应形成不稳定的羟甲基产物,接着该产物脱去一分子水形成亚甲基 Schiff 碱.第二个步骤是通过不可逆反应与另一核苷酸生成亚甲基桥,形成二聚体.其反应式简列于下:



甲醛致 DDC 的研究报告可推断其交联包括 DNA 链间交联和 DNA 链内交联 (如图 2). DDC 修复机制是目前国际上研究的热点,在哺乳动物细胞中其修复过程尚不清楚,还有待下一步研究.

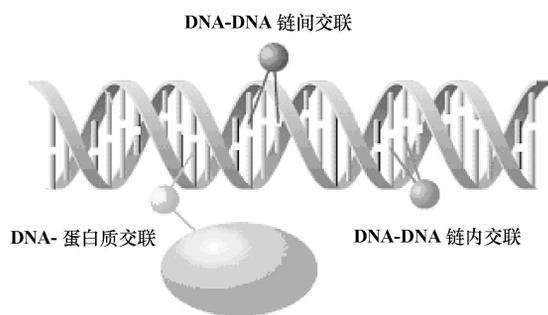


图 2 甲醛所致 DNA 交联

Fig 2 DNA crosslinks induced by FA

通讯作者简介: 杨 旭 (1954—),男,华中师范大学生命科学学院教授,副院长.从事室内空气污染与健康关系研究工作 22 年. E-mail: yangxu@mail.ccnu.edu.cn; Tel: 13871361954 / 027 - 62094654

References:

- Conaway C C, Whysner J, Vema L K, *et al* 1996. Formaldehyde mechanistic data and risk assessment endogenous protection from DNA adduct formation [J]. *Pharmacol Ther*, 71 (1-2): 29—55
- Heck H, Casanova M. 2004. The implausibility of leukemia induction by formaldehyde: a critical review of the biological evidence on distant-site toxicity [J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 40 (2): 92—106
- International Agency for Research on Cancer 2004. IARC classifies formaldehyde as carcinogenic to humans [R]
- Kai Zhang, May Chew, Er B Y, *et al* 2001. Modulation of cisplatin cytotoxicity and cisplatin-induced DNA cross-links in HepG2 cells by regulation of glutathione-related mechanisms [J]. *Mol Pharmacol*, 59 (4): 837—843
- Liu Y S, Lu Z S, Chang M Li, *et al* 2006. Studies on formation and repair of formaldehyde-damaged DNA by detection of DNA-protein crosslinks and DNA breaks [J]. *Frontiers in Bioscience*, 11: 991—997
- Lu Z S, Yan Y, Qiao Y, *et al* 2003. Studies on genotoxicity of gaseous formaldehyde on human buccal cells [J]. *China Environmental Science*, 23 (6): 566—569 (in Chinese)
- Pu Q Q, Bezvoda W R. 1999. Induction of alkylator (methylphalan) resistance in HL60 Cells is accompanied by increased levels of topoisomerase II expression and function [J]. *Mol Pharmacol*, 56 (1): 147—153
- Raquel A byz, Xu Z Y, Vanessa Bello, *et al* 2002. Regulation of cisplatin resistance and homologous recombinational repair by the TFIIH subunit XPD1 [J]. *Cancer Research*, 62 (19): 5457—5462
- Xi Z G, Chao F H, Yang D F, *et al* 2004. Experimental study of the DNA damage induced by formaldehyde [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 24 (4): 719—722 (in Chinese)
- Xia S J, Wu Z L. 2001. *Molecular Toxicology* [M]. Wuhan: Hubei Technology Publishing Company, 104—105 (in Chinese)

中文参考文献:

- 鲁志松, 严彦, 乔琰, 等. 2003. 气态甲醛对人体颊黏膜细胞遗传毒性的研究 [J]. *中国环境科学*, 23 (6): 566—569
- 袭著革, 晁福寰, 杨丹凤, 等. 2004. 甲醛致核酸损伤作用的实验研究 [J]. *环境科学学报*, 24 (4): 719—722
- 夏世钧, 吴中亮. 2001. *分子毒理学基础* [M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 104—105